

Development of an immunosensor for on-line continuous measurement of cardiac injury

Citation for published version (APA):

van der Voort, D. (2003). *Development of an immunosensor for on-line continuous measurement of cardiac injury*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20040130dv>

Document status and date:

Published: 01/01/2003

DOI:

[10.26481/dis.20040130dv](https://doi.org/10.26481/dis.20040130dv)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Chapter 9

Summary

This thesis, which was part of the project entitled “Intravenous biosensor systems for the continuous biochemical monitoring of heart and brain damage” (a collaborative project of the universities of Groningen and Maastricht and supported by the Dutch Technology Foundation, NWO-STW grant nr. GGN 4680), describes the development of a biosensor-device based on the principle of immuno-displacement. The device was developed in order to quantify heart-type fatty acid-binding protein (H-FABP) in a fast continuous manner. Since this protein was first suggested as a plasma marker of acute myocardial infarction (AMI) in 1988, several studies revealed the suitability of FABP especially for early diagnosis of AMI. However, to make such early diagnosis possible, a quantification method is necessary that is more rapid than the currently available commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method, which shows an assay time of approximately one hour. When AMI can be diagnosed more rapidly, early initiation of appropriate therapy will be facilitated. Furthermore, low-risk patients, i.e., patients without cardiac ischemia, can safely be sent home.

Therefore, the studies described in this thesis aimed at developing a more rapid device for the quantification of FABP in blood samples obtained from patients entering the emergency department, or undergoing cardiac surgery.

Chapter 1 provides a brief overview of the importance of diagnosing AMI and summarises briefly all subsequent aspects described in this thesis. Chapter two, the general introduction, provides background information on several topics described in this thesis. First, the causes of cellular injury, and especially myocardial injury, are discussed. When coronary arterial flow supplies insufficient oxygen to meet the demands of the myocardium, myocardial ischemia will occur. Myocytes can sustain ischemia of less than 15 minutes, however ischemia of longer duration usually results in irreversible injury so that the myocyte will die. This process is characterised by disruption of the cell membrane resulting in release into the circulation of several cellular constituents, including specific cardiac marker-proteins. Depending on the type and release characteristics of the different markers, their concentration increase in plasma or serum may provide an indication of the extent of myocardial damage.

Because the new definition of AMI, formulated in 1999, includes the rise and fall of biomarkers in plasma, an overview of characteristics of several markers, including aspartate aminotransferase, creatine kinase, lactate dehydrogenase, troponin, myoglobin and FABP is given in Chapter 2. To monitor a patient in the emergency department, continuous measurements of cardiac proteins would be beneficial. Therefore, the sample should be obtained from the patient in a continuous manner. Continuous sampling techniques include microdialysis, ultrafiltration, and direct intravenous sampling, and

could ideally be combined with the measurement of marker protein concentrations in a biosensor device.

Chapter 3 represents an extensive review concerning the cardiac marker FABP. The characteristic features of this marker are described in more detail because, at present, it is regarded the most suitable early marker for the detection of AMI. FABP is not cardio-specific, but is expressed in relatively low amounts in skeletal muscle. The release and plasma kinetics of FABP closely resemble those of myoglobin, i.e., a rise is detectable as early as 1 to 3 hours after AMI onset, peak values are reached at 6 to 8 hours, and the plasma level returns to normal within 24 to 36 hours. Several clinical studies have unanimously revealed a significantly better performance of FABP over myoglobin for early AMI detection as well as early estimation of infarct size. This superior performance of FABP relates to its relatively low plasma reference concentration. Preliminary evidence suggests that FABP also detects minor myocardial injury and may serve as a prognostic marker for patients with unstable angina pectoris. It is concluded that FABP appears to be an excellent marker for early confirmation or exclusion of AMI. The results are discussed in relation to the recently formulated recommendations for use of marker proteins in the emergency room.

If FABP is used as early marker for the detection of AMI, a biosensor for fast, continuous quantification should be very helpful. Before a description is given of the development of an FABP sensor (Chapter 4), a review is presented on the basic principles of biosensors. Because most biosensors are based on antigen-antibody reactions that are highly sensitive and specific, they are of great value for use in a clinical setting. Furthermore, it becomes more and more important to measure specific compounds in biological matrices (i.e., blood or plasma), in a fast continuous manner. Continuous measurement of proteins (such as FABP) could be established by use of the principle of immuno-displacement. In our case, such displacement can be defined as the breaking of the binding between antigen and antibody when free antigen is added.

For the measurement of FABP several immunoassays and immunosensors already have been developed. An overview of these devices, which include amperometric, optical, grating coupler and flow displacement sensors, is presented in this chapter. The different biosensors are displayed in chronological order and the main features are given. Till now, no biosensor is capable of repeated continuous quantification of FABP in plasma. Therefore, a new biosensor was being developed in our lab. A previous preliminary study already provided proof of principle of immuno-displacement for FABP in buffer.

Chapter 5 describes the first steps in the development of our FABP immunosensor. Continuous measurement of FABP was first mimicked in a discontinuous manner, by repeated addition of FABP-containing solutions to a reaction vial containing a specific matrix, (i.e., the medium containing the analyte), followed by several washing steps. The matrix consisted of Sepharose-bound-FABP to which horseradish peroxidase labeled anti-FABP antibody (Ab-HRP) was coupled. In the presence of free FABP, the

enzyme-labeled antibodies dissociated and were subsequently quantified. Significant displacement in the presence of free FABP was observed in both buffer and human plasma, for duration of at least 9 h. The amount of displaced Ab-HRP from plasma was higher than that from buffer. Therefore, lower FABP concentrations could be measured in plasma compared to buffer ($\geq 20 \mu\text{g/L}$ and $\geq 40 \mu\text{g/L}$ respectively). From this study the principle of displacement was proven for FABP in buffer as well as in plasma samples. These results show the feasibility of a sensor based on the displacement principle to be used for the diagnosis of AMI in emergency medicine.

To further investigate the principle of displacement and more closely approach the use of the immunosensor in the intensive care unit, a continuous flow system was developed ([Chapter 6](#)). During this subsequent study, with slightly different matrix conditions, displacement of FABP in columns, in which a continuous flow was present, could also be proven. To our knowledge, this is the first time that displacement of Ab-HRP was induced by a continuous flow of human plasma from a patient suffering from AMI. A correlation coefficient of 0.96 was found in comparison with the standard ELISA. Although the system is semi-continuous in the way that the amount of displaced Ab-HRP in the samples is measured after finishing the experiment, the column can be used in a continuous measuring device.

The current displacement sensor is not yet able to detect FABP concentrations found in plasma following small infarctions. Therefore, several optimisation experiments, varying the flow velocity as well as the amount of matrix to which the FABP was bound, were performed. It was found that the lower the flow, the more sensitive was the sensor. However, on the other hand, a lower flow results in an increased assay time. An optimum between these two parameters should be determined in future studies.

In [Chapter 7](#), two current other attempts of early diagnosis of AMI using FABP are described. The group of dr. C. McNeil (University of Newcastle upon Tyne, Newcastle, United Kingdom) developed a biosensor based on impedance measurements for FABP quantification. The principle of this sensor is explained and preliminary results are given. Due to several technical problems, this sensor is not yet operational. Moreover, it will not allow continuous measurement of FABP.

In collaboration with the company 8 sens.diagnostic AG (Berlin, Germany) we tested several so-called Cardio-Detect[®] cards. These cards contain a qualitative measuring device for FABP. The precise mechanism underlying this method as well as the first results, are given. The first cards that were tested by a nurse of the coronary care unit showed unreliable results in 30% of cases. A second batch of cards was, after slightly changing several parameters, tested in the hospital of Bernau (Germany). The results of these latter studies are promising. However, more extensive evaluations at distinct hospitals are needed before the Cardio-Detect[®] self-test can be commercialized for personal use.

Finally, [Chapter 8](#) comprises a general discussion of this thesis and provides suggestions for future investigations. The importance of a rapid diagnosis of cardiac injury is discussed as well as the most optimal marker for AMI. Several suggestions for

optimization of the displacement sensor (such as reduction of flow, increase of amount of FABP coupled to its matrix, and increase of the amount of Ab-HRP) as well as future developments (for measurement of liver, kidney or brain damage) of this sensor are given. It is concluded that the displacement sensor described in this thesis could become a powerful tool in different clinical applications. Not only for rapid detection of tissue damage, but also for estimation of the extent of injury, for monitoring patients who are prone to develop injury or undergo surgery, and for risk stratification. Taken together, further studies are of great importance, and although optimization will require time, a sensor that is able to measure micro-necrosis in a fast and continuous manner, has great potential for various purposes.

Samenvatting

Dit proefschrift is een beschrijving van het onderzoek waar ik mij de afgelopen vier jaar mee heb mogen bezighouden. Het project, opgesteld door een samenwerkingsverband van de universiteiten van Groningen en Maastricht, had als titel: "Intraveneuze biosensor systemen voor de continue biochemische monitoring van hart- en hersenschade". Vrij vertaald gaat het over de ontwikkeling van een apparaat, een biosensor, waarmee de hoeveelheid van bepaalde stoffen (zoals eiwitten) in het bloed continue kan worden gemeten. Het werkingsprincipe van deze biosensor berust op het fenomeen van zogenaamde immuno-displacement. Later in dit hoofdstuk kom ik daar nog op terug.

Het eiwit waarvan wij de hoeveelheid in bloed willen bepalen en dat centraal staat in het onderzoek is een relatief klein (14kD) vetzuurbindend eiwit doorgaans aangeduid met de Engelse naam fatty acid binding protein (FABP). Dit FABP komt in vrijwel alle cellen van ons lichaam voor. Er bestaan verschillende typen FABP en het in hart-cellen aanwezige FABP noemt men "hart-type-FABP". Wanneer een cel sterft, bijvoorbeeld als gevolg van zuurstoftekort, breekt de cel open en komt onder andere het FABP buiten de cel terecht. Bij een hartinfarct heeft een deel van de hartspier eveneens een tekort aan zuurstof en zullen meer of minder hartspiercellen afsterven waarbij er meer of minder FABP vrij komt. Dit FABP komt na enige tijd in de bloedbaan terecht. In 1988 is er voor het eerst beschreven dat een verhoogde concentratie van het (hart-type) FABP in de bloedbaan aantoonde dat er ergens in het hart schade moet zijn (of recent moet zijn geweest). Met name op hoge leeftijd komen er nogal eens kleine infarcten voor die aanvankelijk weinig of geen specifieke klachten veroorzaken. Deze patiënten klagen bijvoorbeeld over vermoeidheid. Als er tijdens een onderzoek bij dergelijke patiënten wordt vastgesteld dat er een verhoogde concentratie FABP in de bloedbaan aanwezig is, dan betekent dat wel, dat er met het hart iets aan de hand is.

In de loop van de tijd zijn er verschillende methoden ontwikkeld om de hoeveelheid FABP in bloed te meten. Tot nu toe bestaat er echter nog geen methode die de hoeveelheid FABP in het bloed *snel* (binnen enkele minuten) en *continue* kan bepalen. Het snel kunnen meten van FABP is van belang voor een snelle diagnose (zoals bij een hartinfarct), zodat de medische behandeling dan direct kan worden ingesteld. Een continue meting, ookwel "on-line" meting genoemd, kan bijvoorbeeld van belang zijn voor patiënten op de eerste (hart)hulp. In het geval van een zich ontwikkelende nieuwe hartschade, zou men dit direct, op een monitor, kunnen waarnemen. Ook zou het met een continue meting mogelijk zijn het verloop van de schade in de tijd te vervolgen. Op deze manier kan het beloop van de ziekte zo goed mogelijk worden vervolgd en kan er bij verslechtering van de toestand op tijd worden ingegrepen. Dit proefschrift beschrijft ondermeer de ontwikkeling van een snelle meetmethode voor FABP.

In het eerste hoofdstuk staat globaal omschreven wat er in het proefschrift aan bod komt, en wordt uitgelegd waarom en wanneer het belangrijk is om vast te stellen of en in welke mate een patiënt hartschade heeft. Hoofdstuk 2 geeft een overzicht van de achtergrondkennis van de onderwerpen van dit proefschrift. Er staat beschreven wat

hartschade is, hoe het ontstaat en welke stoffen er vrijkomen bij een infarct. Vanzelfsprekend zijn er naast FABP nog andere stoffen die in de bloedbaan terecht komen als hartcellen afsterven en de belangrijkste worden in hoofdstuk 2 genoemd. Een aantal van deze stoffen kunnen net als FABP gebruikt worden om aan te tonen dat een patiënt hartschade heeft of om dit juist uit te sluiten. Welke van deze stoffen hiervoor het meest geschikt zijn, de zogenoemde hartschademarkstoffen (hartschade markers), is afhankelijk van de eigenschappen van die stof. Zo blijken grote stoffen in het algemeen trager in de bloedbaan terecht te komen dan kleine stoffen; voor een snelle diagnose ligt het dus voor de hand te zoeken naar bruikbare kleine stoffen. Sommige stoffen komen slechts in één type cel voor, en zijn dus celspecifiek, andere stoffen komen in meerdere soorten cellen voor en zijn dus niet celspecifiek. Welke eigenschappen van een stof aangeven of die stof een geschikte marker kan zijn voor hartschade staat ook beschreven in hoofdstuk 2.

Het gebruik van een methode die de concentratie van een stof snel en continu kan bepalen, vereist dat er continue bloed van de patiënt beschikbaar moet zijn (de patiënt moet 'on-line' zijn). Hiervoor bestaan verschillende technieken, zoals microdialyse of ultrafiltratie. Hoe deze technieken precies werken staat eveneens beschreven in hoofdstuk 2.

Hoofdstuk 3 beschrijft diverse eigenschappen van het eiwit FABP, en waarom deze stof momenteel het meest geschikt is als vroege marker voor hartschade. Tot nu toe werd wereldwijd aangenomen dat het eiwit myoglobine de beste vroege marker is voor hartschade. In dit hoofdstuk staat beschreven waarom FABP wellicht een betere vroege hartschademarkter is dan myoglobine.

Gesteld dat FABP gebruikt wordt als vroege marker voor een infarct, dan is het erg nuttig te kunnen beschikken over een FABP-biosensor. In hoofdstuk 4 wordt uitgelegd wat een biosensor precies is, en hoe ze in verschillende groepen kunnen worden onderverdeeld. Biosensoren maken meestal gebruik van de unieke binding tussen een antilichaam en zijn bijbehorende stof. Bij elke stof in het menselijk lichaam hoort namelijk een apart antilichaam; en dit antilichaam bindt zich specifiek aan zijn bijbehorende stof. Zoals boven beschreven is het belangrijk en wordt het steeds belangrijker om in het ziekenhuis bepaalde stoffen in bloed of in plasma snel, continue en makkelijk te kunnen meten.

Er bestaan reeds biosensoren die FABP kunnen meten, maar deze sensoren zijn of heel traag, of maar voor één meting te gebruiken, of ze kunnen FABP niet in bloed meten. Alle tot nu toe in de literatuur beschreven biosensoren voor FABP staan kort beschreven in hoofdstuk 4. In dit hoofdstuk staat ook vermeld welk type biosensor wij hebben ontwikkeld en waarom wij vinden dat dit type wel geschikt is voor het gebruik in, bijvoorbeeld, een ziekenhuis.

In hoofdstuk 5 staan de eerste stappen van de ontwikkeling van onze biosensor beschreven. In het kort volgt hier enige uitleg. In eerste instantie gebruikten we zogenaamde cupjes (kleine kunststof reactie vaatjes), met daarin bepaalde korrels waaraan FABP werd gebonden. Vervolgens werd het antilichaam tegen FABP toegevoegd. Dit antilichaam (met daaraan een label, een chemisch kenmerk) bond zich aan FABP.

Antilichamen die zich niet stevig of niet goed vast hechtten aan FABP werden vervolgens gewassen. Bij het opnieuw toevoegen van een oplossing met FABP (dit noemen we “vrij-FABP”), liet een bepaalde hoeveelheid van de antilichamen van de korrels los en hechte aan het “vrije FABP” (en dit fenomeen heet displacement). Het “vrije” FABP was opgelost in een buffervloeistof, of in plasma. Na het centrifugeren van het cupje konden we dit FABP, en de daaraan gebonden antilichamen, uit het cupje halen en, omdat de antilichamen waren gelabeld, konden we de hoeveelheid antilichamen gebonden aan het vrije FABP, meten. Zowel in een buffervloeistof als in plasma trad displacement op, maar in plasma bleek dat er meer antilichamen werden gebonden aan het vrije FABP.

Andere onderzoekers hebben eerder het displacement fenomeen beschreven voor grote eiwitten. In hoofdstuk 5 hebben we beschreven dat het fenomeen ook optreedt bij de hier beschreven meetmethode van een klein eiwit zoals FABP.

Het bepalen van een hoeveelheid van een stof in een cupje is niet erg praktisch in een ziekenhuis. Zoekend naar verbetering hebben we in de verdere ontwikkeling van de biosensor (hoofdstuk 6) de cupjes vervangen door kleine (6-10 cm) smalle (2 mm) glazen buisjes (kolommen). Door deze kolommen werd met behulp van een pomp, continu vloeistof gezogen. De korrels met FABP met daaraan de antilichamen, die we al gebruikten in de cupjes, hebben we eveneens gebruikt in de kolommen. Daarna onderzochten we of in deze kolommen, in buffer zowel als in plasma, displacement kon optreden. Om displacement te verkrijgen in een kolom bleken minder korrels en minder antilichamen nodig te zijn dan in de cupjes.

Aanvankelijk gebruikten we in de experimenten plasma van een gezonde donor, waaraan we zelf FABP hadden toegevoegd. Om te kunnen onderzoeken of de kolom geschikt zou zijn voor het meten van FABP in “ziek” plasma, hebben we ook het plasma van patiënten met een hartinfarct aan de kolommen toegevoegd. Zoals hierboven beschreven, bevat het bloed van een patiënt met een hartinfarct FABP. Dit FABP induceerde, net als het “vrije” FABP in “gezond” plasma, ook displacement. Hoe meer FABP er in het plasma aanwezig was, hoe meer displacement er optrad.

Het gebruik van een kolom in plaats van een cupje is niet alleen makkelijker en sneller, er is ook minder materiaal voor nodig.

Voor zover wij weten is dit de eerste keer dat er onderzoek werd verricht met plasma van een patiënt met een hartinfarct om in een kolom displacement op te wekken. De kolom is nog niet geschikt om in het ziekenhuis te worden gebruikt, en we kunnen er kleine infarcten nog niet mee aantonen. De kolom moet dus worden verbeterd. Inmiddels weten we al wel dat we kleinere hoeveelheden van FABP kunnen meten als we de vloeistof langzamer door de kolom zuigen. Voorlopig is het nadeel hiervan echter dat de meting langer duurt. Omdat snelheid geboden is moet voor dit probleem een oplossing gezocht worden.

In hoofdstuk 7 staat beschreven dat we betrokken zijn geweest bij het onderzoek van twee andere onderzoeksgroepen. De groep van C. McNeil uit Newcastle, Engeland, probeert een andere biosensormethode uit om FABP snel te kunnen meten. Welke methode dit precies is en hoe het werkt staat beschreven in hoofdstuk 7. Tijdens hun eerdere experimenten traden er enkele problemen op waarvoor nog geen oplossing werd

gevonden. De Engelse biosensor werkt nog niet goed, kan maar één meting doen, en is dus niet geschikt voor continue metingen.

De tweede groep waarmee is samnegewerkt, is die van R. Renneberg in Berlijn, Duitsland. Zij hebben een 'testkaartje' ontwikkeld waarmee FABP gemeten kan worden. Het testkaartje heeft de grootte van een creditcard en de werking lijkt op die van een zwangerschapstest. Als er bloed op de juiste plaats op het kaartje wordt gedruppeld, wordt er een streepje zichtbaar indien de betrokken patiënt een infarct heeft.

De eerste kaartjes die wij hebben getest met bloed van hartinfarct-patiënten werkten niet optimaal. Er waren te veel fout-negatieve resultaten (d.w.z. er ontstond geen streepje als er bloed met FABP erin werd toegevoegd). Het bedrijf heeft de kaartjes daarna kunnen verbeteren en een onderzoeksgroep in Bernau heeft de nieuwe testkaartjes getoetst. De nieuwe resultaten zagen er goed uit. Voordat dit type testkaartje op de markt kan worden gebracht, moet er in verschillende ziekenhuizen nader onderzoek naar de kwaliteit ervan worden verricht. De indicatie voor het gebruik van een testkaartje is anders dan die voor het gebruik van een on-line biosensor; zo spreekt het voor zich dat het kaartje niet geschikt is voor continue metingen.

In hoofdstuk 8 staat de beschouwing en discussie over het onderzoek en wordt er beschreven wat er in de directe toekomst gedaan kan en zou moeten worden om de FABP biosensor verder te ontwikkelen. De discussie gaat met name over de noodzaak om tot een snellere diagnostische methode te komen, waarom een snelle diagnose van hartschade belangrijk is en welke marker daarvoor het meest geschikt zou zijn. Er staat beschreven hoe we denken de functie van de biosensor te verbeteren en waarom dit type biosensor niet alleen geschikt is voor het meten van hartschade, maar ook is te gebruiken voor het meten van schade aan de lever, nieren of hersenen. De belangrijkste conclusie luidt dat de biosensor die we ontwikkeld hebben van grote betekenis kan zijn voor diverse toepassingen. We zijn ons bewust dat er nog veel onderzoek moet worden verricht om de biosensor te verbeteren tot een biosensor die kleine weefschade snel en continu kan bepalen.